4 月 April
2019, 62(4): 418 - 427

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.04.004

梨小食心虫普通气味受体基因 *GmolOR*20 的克隆及表达分析

陈丽慧, 李梅梅, 陈秀琳, 仵均祥*, 许向利*

(西北农林科技大学植物保护学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】通过克隆梨小食心虫 *Grapholita molesta* 触角中的普通气味受体(odorant receptor, OR)OR20 基因,明确其在不同发育期及成虫不同组织中的表达特征,为进一步研究其功能提供理论依据。【方法】根据梨小食心虫雌虫触角转录组数据,利用 RT-PCR 克隆梨小食心虫 OR20 基因的完整开放阅读框;采用 qRT-PCR 检测该基因在不同发育期(卵、1-5 龄幼虫、蛹和雌雄成虫)、成虫不同组织(触角、去除触角的头、胸、腹、足、翅)以及不同日龄(1, 3, 5 和 7 日龄)成虫触角中的表达量。【结果】克隆获得梨小食心虫 *GmolOR*20 基因 cDNA 序列(GenBank 登录号: MH898864)。该基因完整开放阅读框为 1 284 bp,编码 427 个氨基酸,预测蛋白分子量为 49.83 kD,理论等电点为 8.57,具有 7 个跨膜结构域。序列比对和系统进化树结果表明,梨小食心虫 GmolOR20 与苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* CpomOR15 和豆荚小卷蛾 *Cydia nigricana* CnigOR15 亲缘关系较近,氨基酸序列一致性分别为 87% 和 84%。发育表达模式结果显示,*GmolOR*20 在不同发育时期均有表达,雌雄成虫中的表达量显著高于其他发育期的表达量($P<0.05$),但雌、雄虫间的表达量差异不显著。组织表达模式结果表明,*GmolOR*20 主要在成虫触角中高丰度表达,且雌虫触角中的表达量极显著高于雄虫触角中的表达量($P<0.01$);*GmolOR*20 在不同日龄成虫的触角中均有表达,且在 1 和 3 日龄成虫触角中的表达水平显著高于其他日龄($P<0.05$)。【结论】根据 *GmolOR*20 基因的表达谱分析结果,推测 *GmolOR*20 可能参与梨小食心虫对植物挥发物和性信息素的识别。

关键词: 梨小食心虫; 普通气味受体; 基因克隆; 序列分析; 表达谱
中图分类号: Q966　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2019)04-0418-10

Cloning and expression profiling of general odorant receptor gene *GmolOR*20 in the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae)

CHEN Li-Hui, LI Mei-Mei, CHEN Xiu-Lin, WU Jun-Xiang*, XU Xiang-Li* (State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract:【Aim】The objective of this study is to clone the gene of a general odorant receptor (OR) OR20 of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta*, and to investigate its expression profiles in different developmental stages and adult tissues of the moth, so as to provide a theoretical basis for further functional study of the odorant receptor gene.【Methods】According to the antennal transcriptome of female adults of *G. molesta*, the open reading frame (ORF) of OR20 gene of *G. molesta* was cloned by PCR. The expression levels of this gene at different developmental stages (egg, 1-5 instar larva, pupa,

基金项目: 国家"十三五"重点研发专项(2018YFD0201400)
作者简介: 陈丽慧, 女, 1990 年生, 吉林白城人, 博士研究生, 研究方向为农业害虫综合治理, E-mail: clh030201@163.com
* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: junxw@nwsuaf.edu.cn; xuxiangli@nwsuaf.edu.cn
收稿日期 Received: 2018-10-30; 接受日期 Accepted: 2019-01-19

and female and male adults), in different adult tissues (antenna, head with antenna removed, thorax, abdomen, leg and wing), and in antennae of adults of different age (1, 3, 5 and 7 day-old) were detected by qRT-PCR. 【Results】The cDNA sequence of *GmolOR*20 gene (GenBank accession no.: MH898864) in *G. molesta* was obtained. Its complete ORF is 1 284 bp in length, encoding 427 amino acids with the predicted molecular weight of 49.83 kD, the isoelectric point of 8.57, and seven transmembrane domains. Multiple sequence alignment and phylogenetic tree analyses revealed that GmolOR20 is closely related with CpomOR15 of *Cydia pomonella* and CnigOR15 of *Cydia nigricana*, with the amino acid sequence identity of 87% and 84%, respectively. Developmental stage-specific expression results revealed that *GmolOR*20 was expressed in various developmental stages of *G. molesta*, and its expression levels in female and male adults were significantly higher than those in other developmental stages ($P<0.05$), but showed no significant difference between female and male adults. Tissue expression profiles revealed that *GmolOR*20 was highly expressed in the antenna of adults, with extremely significantly higher expression level in the antenna of female adult than in the antenna of male adult ($P<0.01$). *GmolOR*20 was also expressed in antennae of adults of different day-old, with significantly higher expression levels in antennae of the 1 and 3 day-old adults than in antennae of other day-old adults ($P<0.05$). 【Conclusion】Based on the profiling results of *GmolOR*20, we infer that *GmolOR*20 may be involved in the recognition of plant volatiles and pheromones in *G. molesta*.

Key words: *Grapholita molesta*; general odorant receptor; gene cloning; sequence analysis; expression profile

梨小食心虫 *Grapholita molesta* 属于鳞翅目(Lepidoptera)卷蛾科(Tortricidae),是一种严重危害蔷薇科果树的世界性害虫(Rothschild and Vickers, 1991; 陆鹏飞等, 2010; 范仁俊, 2015)。幼虫常蛀食梨、桃、苹果等的果实及桃、李、樱桃等果树的嫩梢,在全国各地大面积发生,并且为害日益加重,尤其是在桃、梨混栽区危害更为严重,加之大范围、高剂量和高频率喷晒农药使其抗药性增强,造成果品品质与产量受到很大影响,成为制约果业健康发展的主要因素之一(郝宝峰等, 2011; 张国辉等, 2012; 仵均祥, 2013)。因而亟需探索出防控梨小食心虫的新技术。

嗅觉系统对于昆虫的生命活动至关重要,昆虫通过嗅觉系统进行寄主选择、交配、觅食、繁殖、信息传递、趋避等行为(Song *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016)。在嗅觉识别过程中需要多种蛋白参与,包括气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)、气味降解酶(odorant degrading enzymes, ODEs)、气味受体(odorant receptors, ORs)及嗅觉神经元膜蛋白(sensory neuron membrane proteins, SNMPs)等,其中 ORs 在气味识别过程中起到重要作用(Bruyne and Baker, 2008; Leal, 2013)。昆虫 ORs 可以分为 2 大类,一类是广泛表达且保守的非典型气味受体(atypical odorant receptor, Orco),另一类是高度分化的传统气味受体(typical odorant receptor, ORx)(An *et al.*, 2016; Wicher, 2018)。Orco 不单独对气味分子起识别作用,而是与 ORs 形成异源二聚体,使 ORs 定位到嗅觉神经元树突膜上,提高 ORs 对植物挥发物及性信息素的敏感性(Larsson *et al.*, 2004)。近年来,随着测序技术和生物信息学的发展,通过基因组和转录组测序的方法,已鉴定出鳞翅目多种昆虫如家蚕 *Bombyx mori* (Wanner *et al.*, 2007)、烟草天蛾 *Manduca sexta* (Groβe-Wilde *et al.*, 2010)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Liu *et al.*, 2012)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (刘程程, 2013)、小地老虎 *Agrotis ipsilon* (Gu *et al.*, 2014)、小菜蛾 *Plutella xylostella* (孔畅仪, 2014)、桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis* (Jia *et al.*, 2016)、苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (Walker *et al.*, 2016)、梨小食心虫(Li *et al.*, 2015)和粘虫 *Mythimna separata* (Chang *et al.*, 2017)等的 ORs 基因。

目前,梨小食心虫嗅觉相关研究主要集中在寄主挥发物的鉴定以及 OBPs, PBPs, CSPs 和 GSTs 等基因的克隆,并对这些基因的 mRNA 表达、蛋白表达和结合特性进行了研究(Zhang *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2014; 杜娟, 2015; Li *et al.*, 2016a, 2016b; 张燕, 2016; 陈秀琳等, 2018; 李帅等, 2018),而对

普通气味受体的研究较少。因此,本研究以梨小食心虫触角转录组数据获得的候选 ORs 基因为基础,通过 RT-PCR 克隆获得梨小食心虫 OR20 基因完整开放阅读框,并对其结构特征进行了生物信息学分析,最后利用实时荧光定量 PCR 技术对 *OR*20 基因在梨小食心虫不同发育期、成虫不同组织和不同日龄成虫触角中的表达差异进行比较分析,为深入研究该基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和组织收集

梨小食心虫于 2008 年采自陕西省杨凌示范区桃园,室内连续饲养 90 余代,每年采集野外种群复壮室内种群。幼虫以人工饲料喂养,成虫以 5% 的蜂蜜水补充营养,均置于人工气候箱内饲养。饲养条件为:温度25℃ ±0.5℃,相对湿度70% ±10%,光周期 15L∶9D,光照强度 4 800 lx(杜娟等, 2010)。

收集 1-3 日龄雌、雄成虫的触角各 400 根、头(去除触角)各 30 个、胸各 20 个、腹各 10 个、50 头虫足、80 头虫翅,卵 200 粒、1 龄幼虫 100 头、2 龄幼虫 50 头、3 龄幼虫 20 头、4 龄幼虫 10 头、5 龄幼虫 3 头、1 日龄蛹 3 头和 1 日龄雌雄成虫各 2 头,以及不同日龄(1, 3, 5 和 7 日龄)成虫触角 400 根,将其置于无 RNA 酶离心管中,收取后立即速冻于液氮,然后放于 -80℃冰箱保存备用。以上各样品为一个生物学重复,收集不同批次梨小食心虫,每种样品 3 个生物学重复。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

参照 RNAiso Plus (TaKaRa, 北京)说明书提取总 1.1 节收集各样品的总 RNA,用核酸蛋白浓度测定仪(SimpliNano, GE)和 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量及浓度。经检测合格后,用 DNase Ⅰ去除基因组 DNA,而后根据 cDNA 反转录试剂盒(Thermo Scientific, 美国)合成 cDNA,保存在 -80℃冰箱中备用。

1.3 引物设计

根据梨小食心虫雌虫触角转录组数据(GenBank 登录号: SRR1424578)(Li *et al.*, 2015)的序列,利用 Primer 5.0 软件设计梨小食心虫 OR20 基因的全长引物,Primer3 在线软件(http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/# PRIMER _ SEQUENCE _ INPUT)设计定量引物。选用梨小食心虫 *Actin* 基因为内参基因(GenBank 登录号: JN857938)(张国辉, 2012)(表 1)。所需引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	引物序列(5′-3′) Primer sequences	引物用途 Usage of primers
OR20-F	ACGCCATGAAAACTTATAAAA	开放阅读框扩增 Amplification of ORF
OR20-R	TATTGACTCCACCACAAAGT	
qOR20-F	AGGAGTTTAAGCCGTTTCGC	实时荧光定量 PCR qPCR
qOR20-R	TTACCACCAGTATCGCCAGG	
Actin-F	TGCGTGACATCAAGGAGAAG	
Actin-R	TACCGATGGTGATGACCTGA	

1.4 基因克隆

以 1.2 节合成的梨小食心虫雌虫触角 cDNA 为模板,用表 1 中的特异引物扩增梨小食心虫 *OR*20 基因的 ORF 全长序列。PCR 反应体系(20 μL): 2×Es Taq MasterMix(康为世纪, 北京) 10 μL, cDNA 模板 1 μL, 正反向引物(10 μmol/L)各 1 μL, RNase-free Water 7 μL。PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,用 DNA 纯化回收试剂盒(天根, 北京)回收目的片段,将其连接在 pMD™-19T 克隆载体(TaKaRa, 北京)并转化到 DH5α 感受态细胞(天根, 北京),蓝白斑筛选后,随机挑取 7 个阳性克隆在 LB 液体培养基(含有 100 mg/mL Amp)中振荡过夜培养,经菌液 PCR 验证后,将菌液送至北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序。

1.5 序列分析

利用在线程序 ORF Finder (https://www.ncbi.

nlm. nih. gov/orffinder/）预测梨小食心虫 *OR*20 基因的开放阅读框，BLAST（https：//blast. ncbi. nlm. nih. gov/Blast. cgi）对 OR20 序列进行比对分析，ExPASy-Compute pI/MW tool（https：// web. expasy. org/compute_pi/）预测蛋白分子量和理论等电点，TMHMM-2.0（http：// www. cbs. dtu. dk/services/TMHMM-2.0/）预测跨膜结构域。使用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对，使用 MEGA 6.0 软件采用邻接法（neighbor-joining method）构建系统进化树（Bootstrap：1 000 次）。

1.6　实时定量 PCR

将 1.2 节获得的梨小食心虫成虫不同组织、不同日龄成虫触角和不同发育期 cDNA 模板进行 10 倍稀释，并根据 TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ（Tli RNaseH Plus）试剂盒进行实时荧光定量 PCR，使用 CFX-96 实时荧光定量 PCR 仪（Bio-Rad）检测 *OR*20 基因在成虫不同组织、不同日龄成虫触角和不同发育期的表达情况，qPCR 所需引物见表 1。qPCR 反应体系（20 μL）：SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μL，cDNA 模板 2 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 0.8 μL，RNase-free Water 6.4 μL。qPCR 反应条件：95℃ 30 s；95℃ 10 s，60℃ 30 s，72℃ 30 s，40 个循环；60～95℃记录熔解曲线。每种样品各 3 个生物学重复和 3 个技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量（Livak and Schmittgen，2001）。

1.7　数据分析

目的基因在雌雄成虫同一组织间的表达差异利用 SPSS 17.0 软件进行独立样本 *T* 检验（independent samples *T*-test）；不同日龄成虫触角间以及不同发育期间的表达差异利用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析（Turkey 氏检验）。

2　结果

2.1　*GmolOR*20 的克隆和序列分析

通过基因克隆获得梨小食心虫普通气味受体基因 cDNA 序列，命名为 *GmolOR*20（GenBank 登录号：MH898864）；其完整开放阅读框（ORF）为 1 284 bp，编码 427 个氨基酸（图 1）。利用 ExPASy-Compute pI/MW Tool 在线软件预测 GmolOR20 的蛋白分子量和理论等电点，分别为 49.83 kD 和 8.57。利用 TMHMM-2.0 在线软件预测 GmolOR20 的蛋白跨膜结构，获得的序列有 7 个跨膜结构域（图 2），分别位于第 50－72，87－109，152－174，211－233，287－309，314－331 和 366－388 位氨基酸处，N 端位于细胞膜内，C 端位于细胞膜外。

```
ATG AAA ACT TAT AAA AGG AAG GAG TCC AGC ACA CTC CCG TTG GTT CCA GCA ACT GAC GTT CAG GAG TTT AAG CCG TTT CGC GAG ACA TAC   90
 M   K   T   Y   K   R   K   E   S   S   T   L   P   L   V   P   A   T   D   V   Q   E   F   K   P   F   R   E   T   Y    30
AAA ATC ATT ACG TTC AAC ATG ATC GTG GGT ATG CTG TAC CCC ACA CCC GAC ACC GCC GCG TGC AGA CTT GTG GGC ATC CTG GCG ATA CTG  180
 K   I   I   T   F   N   M   I   V   G   M   L   Y   P   T   P   D   T   A   A   C   R   L   V   G   I   L   A   I   L    60
GTG GTA ATG ACC CCG GTA TGC TTC GCG GCG CTG CTG GAC ATG TGG ACG AGC TGG GTG CGG GGA GAC ATC ATC AAC ATC ATC AGA CAT TGT  270
 V   V   M   T   P   V   C   F   A   A   L   L   D   M   W   T   S   W   V   R   G   D   I   I   N   I   I   R   H   C    90
ACC GTC ATG GGG CCG TTC CTG GGA GCC ATA TTT AAG ATG ATG CTG TTC TTC TAC AGC AGG AAG GAA GCG TGG GCT ATC ATC CAG AAG ATT  360
 T   V   M   G   P   F   L   G   A   I   F   K   M   M   L   F   F   Y   S   R   K   E   A   W   A   I   I   Q   K   I   120
GAC GCA GAC CAC GCT CGC TAC AAC ACT ATC CCG GAA GAA CAC AAA GAG ATT GCG CGA CGG CAC ATA CAA AAC ACC CAG TAC TAT AGC GAG  450
 D   A   D   H   A   R   Y   N   T   I   P   E   E   H   K   E   I   A   R   R   H   I   Q   N   T   Q   Y   Y   S   E   150
AAA TGC TGG TCA ATA ACC GTA GCC ACC TGC GTG TTG ACA TTC CCT CTG ACT GCC GTC GTC CTA ACC CTC TAC AAC TCC GTC TTC AAA GAG  540
 K   C   W   S   I   T   V   A   T   C   V   L   T   F   P   L   T   A   V   V   L   T   L   Y   N   S   V   F   K   E   180
GAA CCA ATC AAA TAC ATG ATC CAC GAC ATC GAC AAA CCT TTC TCG CCG CGA GAA GAC CGC TTC TCA TCA CCA TAC TTC GAA GTC ATG TTC  630
 E   P   I   K   Y   M   I   H   D   I   D   K   P   F   S   P   R   E   D   R   F   S   S   P   Y   F   E   V   M   F   210
TTC TAC ATG TCA ATA TGT TCC TTA TTC TAC ATC ATA AGC TTT ACC GGT TTC GAC GCG TTT TTT GGT ATT ACA ATC AAC CAT GCC TGT ATG  720
 F   Y   M   S   I   C   S   L   F   Y   I   I   S   F   T   G   F   D   A   F   F   G   I   T   I   N   H   A   C   M   240
AAG ATG GAG TTG GCG TGC AAG ACT ATG GCG GAC GCC ATG TTG GAG GTG GAC AGG GGT AGT CGG CAT AGG AGG ATG TTG GAT GTT ATC TCG  810
 K   M   E   L   A   C   K   T   M   A   D   A   M   L   E   V   D   R   G   S   R   H   R   R   M   L   D   V   I   S   270
GAG CAG AAC GAT TTG TTT GGA ATG GTG GAA CTT ATA CAA GAA ACT TTT GCT ATT TGG CTC GGA ATA ATC GTC ATT GCG ACA ATG TTA CAA  900
 E   Q   N   D   L   F   G   M   V   E   L   I   Q   E   T   F   A   I   W   L   G   I   I   V   I   A   T   M   L   Q   300
ATT TGC AAC TGT ATG TAC CAG ATA ATA GAG GGG TAC GGA ATC GAT CCT AGA TAC CTA GTG TTC ATA GTT GGC ACT ATA GCC CAT ATC TAC  990
 I   C   N   C   M   Y   Q   I   I   E   G   Y   G   I   D   P   R   Y   L   V   F   I   V   G   T   I   A   H   I   Y   330
CTG CCG TGC CGA TAC GCG GCT AAG CTA CAA GCT AGT GCC CTA GAG GTC TCA ACA CAT CTA TAC TGC TGC GGG TGG GAG CGA GTG AAC GAC 1080
 L   P   C   R   Y   A   A   K   L   Q   A   S   A   L   E   V   S   T   H   L   Y   C   C   G   W   E   R   V   N   D   360
GAG AGA GCG CGC AAG ATG ATA ATA TTC ATG ATC GCA CGC GCA CAG ATC CCA ATG AAA ATC ACA GCC TTC AAC ATG TTT TTC TTC GAC ATG 1170
 E   R   A   R   K   M   I   I   F   M   I   A   R   A   Q   I   P   M   K   I   T   A   F   N   M   F   F   F   D   M   390
GAC CTA TTT GTC TCT GTA AGT AGC CGA ACG GGC AAA AAT ATA TAC ACA CTA GAA AAA AAA AAT ACT ATG AGA AAA CTA TTG TAC AGA ATG 1260
 D   L   F   V   S   V   S   S   R   T   G   K   N   I   Y   T   L   E   K   K   N   T   M   R   K   L   L   Y   R   M   420
TAT ACT TTG TGG TGG AGT CAA TAA                                                                                         1284
 Y   T   L   W   W   S   Q   *                                                                                          427
```

图 1　梨小食心虫 *GmolOR*20 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *GmolOR*20 in *Grapholita molesta*

方框表示起始密码子和终止密码子；下划线表示预测的 7 个跨膜结构域。The initiation and termination codons are marked by rectangles, and seven predicted transmembrane domains are underlined.

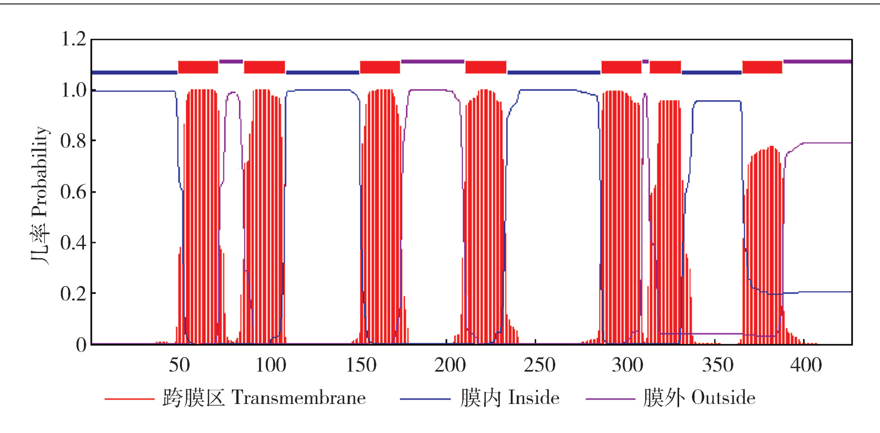


图 2　梨小食心虫 GmolOR20 跨膜结构域预测

Fig. 2　The predicted transmembrane domains of GmolOR20 in *Grapholita molesta*

2.2　GmolOR20 的序列比对和进化树分析

通过 BLAST 进行同源性检索，选择与 GmolOR20 具有同源的鳞翅目昆虫 ORs 氨基酸序列进行比对，结果显示（图 3），梨小食心虫 GmolOR20 与苹果蠹蛾 CpomOR15 的氨基酸序列一致性最高，达 87%；其次是与豆荚小卷蛾 *Cydia nigricana* CnigOR15 的氨基酸序列一致性，为 84%；与芽广翅小卷蛾 *Hedya nubiferana* HunbOR14、苹果蠹蛾 CpomOR14 和山毛榉卷叶蛾 *Cydia fagiglandana* CfagOR14 的氨基酸序列一致性相对较低，分别为 76%，75% 和 74%。根据系统进化树（图 4）的结果可知，梨小食心虫 GmolOR20 与豆荚小卷蛾 CnigOR15 和苹果蠹蛾 CpomOR15 聚成一支，即梨小食心虫与豆荚小卷蛾、苹果蠹蛾的亲缘关系最近。

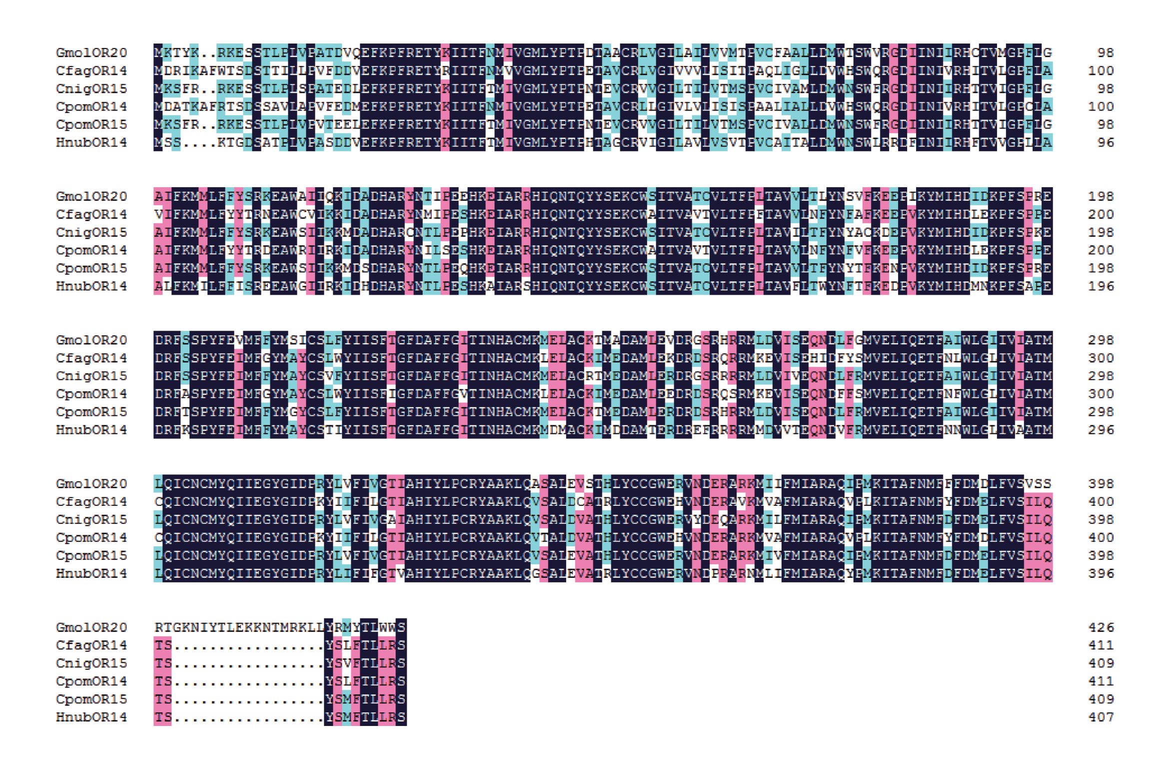


图 3　梨小食心虫 GmolOR20 与其他昆虫气味受体氨基酸序列比对

Fig. 3　Alignment of amino acid sequences of GmolOR20 of *Grapholita molesta* with olfactory receptors (ORs) of other insects

ORs 蛋白来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of ORs and their GenBank accession numbers: GmolOR20: 梨小食心虫 *Grapholita molesta* (MH898864); CfagOR14: 山毛榉卷叶蛾 *Cydia fagiglandana* (KY283648.1); CnigOR15: 豆荚小卷蛾 *Cydia nigricana* (KY283725.1); CpomOR14: 苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (JN836682.1); CpomOR15: 苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (JN836688.1); HnubOR14: 芽广翅小卷蛾 *Hedya nubiferana* (KY283594.1).

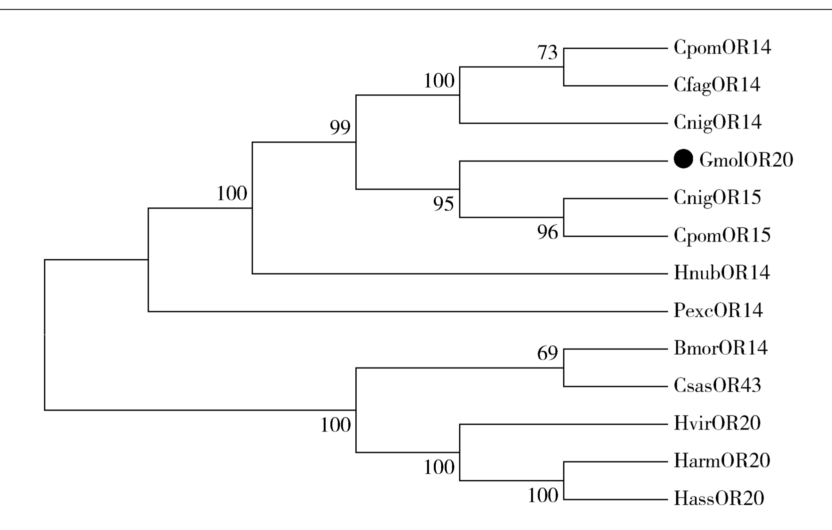


图 4　基于氨基酸序列构建的梨小食心虫 GmolOR20 和几种鳞翅目昆虫气味受体的系统进化树

Fig. 4　Phylogenetic tree of GmolOR20 of *Grapholita molesta* and olfactory receptors (ORs) of several lepidopteran insects based on the amino acid sequence

ORs 蛋白来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of ORs and their GenBank accession numbers：GmolOR20：梨小食心虫 *Grapholita molesta* (MH898864)；CpomOR14：苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (JN836682.1)；CpomOR15：苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (JN836688.1)；CfagOR14：山毛榉卷叶蛾 *Cydia fagiglandana* (KY283648.1)；CnigOR14：豆荚小卷蛾 *Cydia nigricana* (KY283724.1)；CnigOR15：豆荚小卷蛾 *Cydia nigricana* (KY283725.1)；HnubOR14：芽广翅小卷蛾 *Hedya nubiferana* (KY283594.1)；PexcOR14：绿头卷叶蛾 *Planotortrix excessana* (KM678300.1)；BmorOR14：家蚕 *Bombyx mori* (AB472096.1)；CsasOR43：桃小食心虫 *Carposina sasakii* (MG546638.1)；HvirOR20：烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* (AJ748335.1)；HarmOR20：棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (EU599568.1)；HassOR20：烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* (JX982547.1).

2.3　*GmolOR*20 mRNA 的表达谱分析

通过标准曲线结果可知，目的基因与内参基因的扩增效率为 90% ~110%，说明这些引物具有良好的特异性。从 *GmolOR*20 在梨小食心虫不同发育时期的表达谱发现(图 5)，*GmolOR*20 在各个发育时期均有表达，在卵、幼虫、蛹期的表达量较低。雌、雄成虫中的表达量均显著高于其他发育期的表达量($P<0.05$)；雌成虫中的表达量高于雄成虫，但雌、雄虫间表达量差异不显著($P>0.05$)。雌成虫中的表达量分别是卵，1，2，3，4 和 5 龄幼虫及蛹中的 3.13，12.85，10.98，17.57，14.64，8.11 和 5.28 倍；雄成虫中的表达量分别是卵，1，2，3，4 和 5 龄幼虫及蛹中的 3.05，12.51，10.69，17.10，14.25，7.89 和 5.13 倍。

*GmolOR*20 主要在成虫触角中表达，在成虫其他组织中微量表达或痕量表达(图 6)。雌、雄虫触角中表达量采用独立样本 *T* 检验表明，在雌虫触角中 *GmolOR*20 表达量极显著高于雄虫的表达量($P<0.01$)，达雄虫触角中的 6.11 倍。

*GmolOR*20 在不同日龄成虫触角中均有表达，随着日龄的增长，其表达量呈先上升后下降的趋势。1 日龄时表达量较低，而后增加，在 3 日龄时表达量达到最高，随后表达量降低，7 日龄时表达量最低(图 7)。3 日龄成虫中的表达量分别是 1，5 和 7 日龄成虫的 1.06，1.26 和 2.59 倍，并且 1、3 日龄中表达量显著高于其他日龄($P<0.05$)。

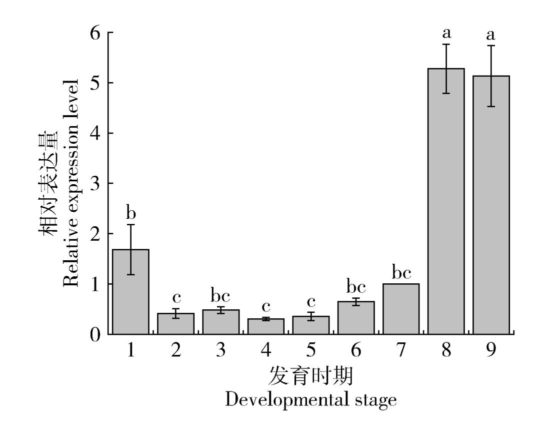


图 5　*GmolOR*20 在梨小食心虫不同发育时期的相对表达量

Fig. 5　Relative expression level of *GmolOR*20 in different developmental stages of *Grapholita molesta*

1：卵 Egg；2 – 6：分别是 1 – 5 龄幼虫 1st – 5th instar larva, respectively；7：蛹 Pupa；8：雌成虫 Female adult；9：雄成虫 Male adult. 图中数据为平均值 ± 标准差，不同小写字母表示不同发育时期之间的显著性差异($P<0.05$，Turkey 氏检验)。Data in the figure are mean ± *SD*. Different lowercase letters indicate significant differences among different developmental stages ($P<0.05$, Turkey's test).

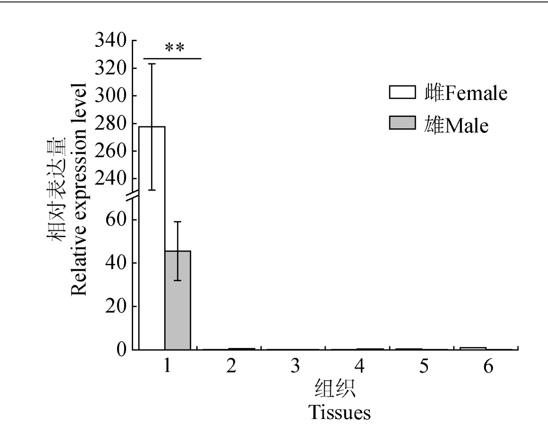


图 6 *GmolOR*20 在梨小食心虫成虫不同组织中的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of *GmolOR*20 in different tissues of adult *Grapholita molesta*

1：触角 Antenna；2：头(去触角) Head(with antenna removed)；3：胸 Thorax；4：腹 Abdomen；5：足 Leg；6：翅 Wing. 图中数据为平均值 ± 标准差，双星号表示雌雄之间的极显著差异($P < 0.01$，独立样本 T 检验)。Data in the figure are mean ± *SD*. The double asterisk indicates extremely significant difference between female and male ($P < 0.01$, independent samples T-test).

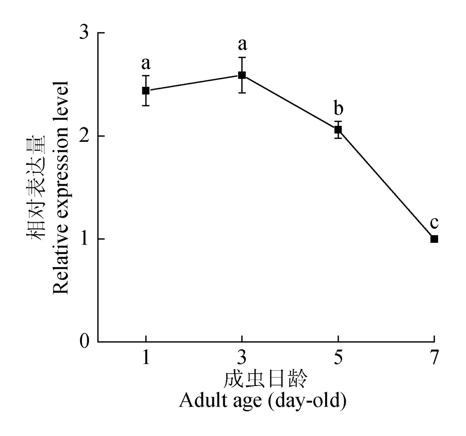


图 7 *GmolOR*20 在梨小食心虫不同日龄成虫触角中的相对表达量

Fig. 7 Relative expression level of *GmolOR*20 in antennae of *Grapholita molesta* adults of different age (day-old)

图中数据为平均值 ± 标准差，不同小写字母表示不同日龄成虫触角之间差异显著($P < 0.05$，Turkey 氏检验)。Data in the figure are mean ± *SD*. Different lowercase letters indicate significant differences in antennae among adults of different day-old ($P < 0.05$, Turkey's test).

3 讨论

基于梨小食心虫雌虫触角转录组测序和分析的基础上，克隆获得了一个普通气味受体基因 *GmolOR*20(GenBank 登录号：MH898864)的 cDNA 全长，其 ORF 为 1 284 bp，编码 427 个氨基酸。氨基酸序列预测结果表明，GmolOR20 含有 7 个跨膜结构域，N 端位于细胞膜内(图 2)，与前人研究的昆虫气味受体具有 4～8 个跨膜结构域这一特征相吻合(Benton *et al*., 2006；Bengtsson *et al*., 2012；杨乐等，2017；张新玥等，2018)。氨基酸序列比对结果显示，梨小食心虫 GmolOR20 与苹果蠹蛾 CpomOR15 和豆荚小卷蛾 CnigOR15 的序列一致性较高，分别为 87% 和 84%，说明它们可能是直系同源蛋白(图 3)。经系统进化树进一步验证序列比对结果，发现 GmolOR20 与 CnigOR15 和 CpomOR15 聚为一支，表明三者的亲缘关系较近(图 4)。

不同气味受体的功能差异很大，其表达模式也存在很大差异。普通气味受体主要在昆虫的触角中表达，此外，在昆虫的下颚须和喙中也有表达(王桂荣等，2004；巩中军等，2008；杜亚丽等，2017)。前人研究发现，除性信息素受体基因外，有些普通气味受体基因在雄虫触角中的表达量高于雌虫，在头、胸、腹、足、翅等组织中未见表达，如绿盲蝽 *AlucOR*40、棉铃虫 *HarmOR*18 和烟夜蛾 *HassOR*18(张帅等，2009；张元臣等，2013；张志翔等，2016)，其中，利用双电极电压钳记录系统研究 AlucOR40 功能，结果显示 AlucOR40 只对植物气味反-2-己烯醇具有特异反应，并且 EAG 结果表明绿盲蝽雌雄虫都对反-2-己烯醇有反应，推测它们可能与雄虫对雌虫的识别有关。同时，有些普通气味受体基因在雌、雄成虫触角间无显著性差异，其中一些基因在头、喙和下唇须中有少量表达，如棉铃虫 *HarmOR*9 和 *HarmOR*29，小菜蛾 *PxylOR*9，*PxylOR*16，*PxylOR*17 和 *PxylOR*18 以及斜纹夜蛾 *SlituOR*12(Zhang *et al*., 2013；孔畅仪等，2014；刘宁灿等，2014；刘一鹏等，2015)。其中，利用双电极电压钳记录系统研究 PxylOR9 和 SlituOR12 功能，发现它们分别对植物挥发物 β-紫罗兰酮、*cis*-3-hexenyl acetate 有反应(Zhang *et al*., 2013；刘一鹏等，2015)，它们可能参与寄主定位等雌雄虫共有的行为活动。还有些普通气味受体基因主要在成虫触角中表达，在成虫其他组织中微量表达或痕量表达，并且雌虫触角中的表达量极显著高于雄虫，如甜菜夜蛾 *SexiOR*3 和 *SexiOR*18、棉铃虫 *HarmOR*4 和 *HarmOR*12、烟夜蛾 *HassOR*23(张帅等，2009；刘程程等，2013；Liu *et al*., 2014；Wu *et al*., 2018)，本研究的结果与前人的研究结果基本一致。其中，利用双电极电压钳记录系统研究 SexiOR3 和

HassOR23 功能，结果表明 SexiOR3 和 HassOR23 对植物气味 *E*-β-farnesene 反应最大（Liu *et al.*, 2014；Wu *et al.*, 2018），暗示其可能参与植物挥发物的识别；利用原位杂交技术研究 *SexiOR*18 表达分布，发现在感受性信息素和普通气味的毛形感器和锥形感器中均有分布（刘程程等，2013），暗示其可能参与了性信息素和植物气味分子的识别。因此，推测 *GmolOR*20 可能参与植物挥发物和性信息素的识别。

本实验室前期研究发现梨小食心虫成虫的求偶交配行为多发生在羽化后第 3 天（张国辉和仵均祥，2012）。本研究发现，*GmolOR*20 基因随着梨小食心虫成虫日龄的增加，表达量呈先上升后下降趋势，并且 3 日龄成虫触角中的表达量最高（图 7），说明交配后表达量显著降低，得出与马龙（2013）相似的研究结果，推测该基因可能对雄蛾的识别有关。另外，从 *GmolOR*20 在梨小食心虫不同发育时期的表达模式可知，*GmolOR*20 在各个发育时期均有表达，雌、雄成虫中的表达量显著高于其他发育期（图 5），这与前人的研究结果相似（王翔，2013；赵海明等，2013；Zhang *et al.*, 2017），推测 *GmolOR*20 可能参与梨小食心虫的整个发育过程，主要参与对寄主植物挥发物的识别过程。

本研究通过克隆 *GmolOR*20 基因，明确该基因在梨小食心虫不同发育期、成虫不同成虫组织以及不同日龄成虫触角中的表达情况，推测其可能参与梨小食心虫对植物挥发物和性信息素的识别，为进一步研究其蛋白功能奠定基础，也为梨小食心虫其他气味受体的研究提供参考，更为开发绿色高效引诱剂提供理论依据。

参考文献（References）

An XK, Sun L, Liu HW, Liu DF, Ding YX, Li LM, Zhang YJ, Gou YY, 2016. Identification and expression analysis of an olfactory receptor gene family in green plant bug *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). *Sci. Rep.*, 6: 37870.

Bengtsson JM, Trona F, Montagné N, Anfora G, Ignell R, Witzgall P, Jacquin-Joly E, 2012. Putative chemosensory receptors of the codling moth, *Cydia pomonella*, identified by antennal transcriptome analysis. *PLoS ONE*, 7(2): e31620.

Benton R, Sachse S, Michnick SW, Vosshall LB, 2006. A typical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors *in vivo*. *PLoS Biol.*, 4(2): 240–257.

Bruyne M, Baker TC, 2008. Odor detection in insects: volatile codes. *J. Chem. Ecol.*, 34(7): 882–897.

Chang XQ, Nie XP, Zhang Z, Zeng FF, Lv L, Zhang S, Wang MQ, 2017. *De novo* analysis of the oriental armyworm *Mythimna separata* antennal transcriptome and expression patterns of odorant-binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol. D*, 22: 120–130.

Chen XL, Su L, Chen LH, Li YP, Wu JX, Li GW, 2018. Molecular cloning, expression profiling and binding characterization of a Minus-C odorant binding protein from the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomol. Sin.*, 61(7): 771–783. [陈秀琳，苏丽，陈丽慧，李怡萍，仵均祥，李广伟，2018. 梨小食心虫 Minus-C 气味结合蛋白的分子克隆、表达谱及结合特性分析. 昆虫学报，61(7): 771–783]

Du J, 2015. Effect of Volatile in Migratory between Peach Trees and Pear Trees and Management Threshold of Oriental Fruit Moth. PhD Dissertation, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. [杜娟，2015. 梨小食心虫 *Grapholita molesta* 在桃、梨之间转移危害的挥发物诱导与防治指标研究. 陕西杨凌：西北农林科技大学博士学位论文]

Du J, Wang YR, Wu JX, 2010. Effect of four different artificial diets on development and reproduction of *Grapholitha molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Shanxi Agric. Univ.* (*Nat. Sci. Ed.*), 30(3): 228–231. [杜娟，王艳蓉，仵均祥，2010. 不同饲料配方对梨小食心虫生长发育及繁殖的影响. 山西农业大学学报(自然科学版)，30(3): 228–231]

Du YL, Wang SJ, Zhao HT, Pan JF, Yang S, Guo LN, Xu K, Jiang YS, 2017. Cloning and temporal-spatial expression profiling of the odorant receptor gene *AcerOR*113 in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*. *Acta Entomol. Sin.*, 60(5): 533–543. [杜亚丽，王树杰，赵慧婷，潘建芳，杨爽，郭丽娜，徐凯，姜玉锁，2017. 中华蜜蜂气味受体基因 *AcerOR*113 的克隆与时空表达分析. 昆虫学报，60(5): 533–543]

Fan RJ, 2015. Regulation and Control of Fruit Borers in Northern China. China Agriculture Press, Beijing. 27–31. [范仁俊，2015. 北方果树食心虫发生规律与控制. 北京：中国农业出版社. 27–31]

Gong ZJ, Zhou WW, Zhu ZR, Cheng JA, 2008. Advances in the studies of insect olfactory receptors. *Acta Entomol. Sin.*, 51(7): 761–768. [巩中军，周文武，祝增荣，程家安，2008. 昆虫嗅觉受体的研究进展. 昆虫学报，51(7): 761–768]

Groβe-Wilde E, Stieber R, Forstner M, Krieger J, Wicher D, Hansson BS, 2010. Sex-specific odorant receptors of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Front. Cell. Neurosci.*, 4: 22.

Gu SH, Sun L, Yang RN, Wu KM, Guo YY, Li XC, Zhou JJ, Zhang YJ, 2014. Molecular characterization and differential expression of olfactory genes in the antennae of the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*. *PLoS ONE*, 9(8): e103420.

Hao BF, Xu CX, He LM, Jiao R, Yu LC, 2011. Study on occurrence of oriental fruit moth in eastern Hebei. *J. Hebei Agric. Sci.*, 15(3): 30–32, 38. [郝宝峰，许长新，贺丽敏，焦蕊，于丽辰，2011. 冀东地区梨小食心虫发生规律研究. 河北农业科学，15(3): 30–32, 38]

Jia XJ, Wang HX, Yan ZG, Zhang MZ, Wei CH, Qin XC, Ji WR, Falabella P, Du YL, 2016. Antennal transcriptome and differential expression of olfactory genes in the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Sci. Rep.*, 6: 29067.

Kong CY, 2014. Gene Cloning and Expression Analysis of Odorant

Receptors and Ionotropic Receptors in the Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). MSc Thesis, Northeast Forestry University, Harbin. [孔畅仪, 2014. 小菜蛾气味受体和离子型受体的克隆与表达. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文]

Kong CY, Wang GR, Liu Y, Yan SC, 2014. Gene cloning and expression analysis of three odorant receptors in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Sci. Agric. Sin.*, 47(9): 1735 – 1742. [孔畅仪, 王桂荣, 刘杨, 严善春, 2014. 小菜蛾三个普通气味受体基因的克隆及表达谱. 中国农业科学, 47(9): 1735 – 1742]

Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB, 2004. *Or83b* encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43(5): 703 – 714.

Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 373 – 391.

Li GW, Chen XL, Li BL, Zhang GH, Li YP, Wu JX, 2016a. Binding properties of general odorant binding proteins from the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). *PLoS ONE*, 11(5): e0155096.

Li GW, Du J, Li YP, Wu JX, 2015. Identification of putative olfactory genes from the oriental fruit moth *Grapholita molesta* via an antennal transcriptome analysis. *PLoS ONE*, 10(11): e0142193.

Li GW, Zhang Y, Li YP, Wu JX, Xu XL, 2016b. Cloning, expression, and functional analysis of three odorant-binding proteins of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 91(2): 67 – 87.

Li S, Su L, Li BL, Li YP, Li GW, Wu JX, 2018. cDNA cloning, prokaryotic expression and enzymatic characteristics of the glutathione S-transferase GmolGST6 in *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomol. Sin.*, 61(4): 398 – 409. [李帅, 苏丽, 李伯辽, 李怡萍, 李广伟, 仵均祥, 2018. 梨小食心虫谷胱甘肽S-转移酶GmolGST6的基因克隆、原核表达和酶学特征. 昆虫学报, 61(4): 398 – 409]

Liu CC, 2013. Cloning, Expression and Function Study of Odorant Receptors and Sensory Neuron Membrane Proteins in *Spodoptera exigua*. MSc Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [刘程程, 2013. 甜菜夜蛾嗅觉受体和感觉神经元膜蛋白基因的克隆、表达定位及功能研究. 南京: 南京农业大学硕士学位论文]

Liu CC, Liu Y, Guo MB, Cao DP, Dong SL, Wang GR, 2014. Narrow tuning of an odorant receptor to plant volatiles in *Spodoptera exigua* (Hübner). *Insect Mol. Biol.*, 23(4): 487 – 496.

Liu CC, Liu Y, Zhang J, Wang GR, Dong SL, 2013. Cloning and localization of an odorant receptor gene *OR*18 in the antenna of *Spodoptera exigua*. *Sci. Agric. Sin.*, 46(20): 4263 – 4271. [刘程程, 刘杨, 张进, 王桂荣, 董双林, 2013. 甜菜夜蛾触角气味受体基因*OR*18的克隆和表达定位. 中国农业科学, 46(20): 4263 – 4271]

Liu NC, Zhang J, Wang GR, Liu Y, Yan SC, 2014. Cloning and tissue expression analysis of general odorant receptor genes *HarmOR*9 and *HarmOR*29 in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(5): 522 – 529. [刘宁灿, 张进, 王桂荣, 刘杨, 严善春, 2014. 棉铃虫普通气味受体基因*HarmOR*9和*HarmOR*29的克隆和组织表达分析. 昆虫学报, 57(5): 522 – 529]

Liu Y, Gu SH, Zhang YJ, Guo YY, Wang GR, 2012. Candidate olfaction genes identified within the *Helicoverpa armigera* antennal transcriptome. *PLoS ONE*, 7(10): e48260.

Liu YP, Liu Y, Yang T, Gui FR, Wang GR, 2015. Identification and characterization of a general odorant receptor gene *PxylOR*9 in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(5): 507 – 515. [刘一鹏, 刘杨, 杨婷, 桂富荣, 王桂荣, 2015. 小菜蛾普通气味受体基因*PxylOR*9的鉴定及功能研究. 昆虫学报, 58(5): 507 – 515]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ methods. *Methods*, 25(4): 402 – 408.

Lu PF, Huang LQ, Wang CZ, 2010. Semiochemicals used in chemical communication in the oriental fruit moth, *Grapholitha molesta* Busck (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomol. Sin.*, 53(12): 1390 – 1403. [陆鹏飞, 黄玲巧, 王琛柱, 2010. 梨小食心虫化学通信中的信息物质. 昆虫学报, 53(12): 1390 – 1403]

Ma L, 2013. Cloning and Expression Profiles of Olfactory Receptor Genes in *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). MSc Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [马龙, 2013. 中红侧沟茧蜂嗅觉受体基因的克隆和组织表达谱分析. 南京: 南京农业大学硕士学位论文]

Rothschild GHL, Vickers RA, 1991. Biology, ecology and control of the oriental fruit moth. In: van der Geest LPS, Evenhuis HH eds. Tortricid Pests: Their Biology, Natural Enemies, and Control. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 389 – 412.

Song HG, Kwon JY, Han HS, Bae YC, Moon C, 2008. First contact to odors: our current knowledge about odorant receptors. *Sensors*, 8: 6303 – 6320.

Song YQ, Dong JF, Qiao HL, Wu JX, 2014. Molecular characterization, expression patterns and binding properties of two pheromone-binding proteins from the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck). *J. Integr. Agr.*, 13(12): 2709 – 2720.

Walker WB, Francisco G, Garczynski SF, Witzgall P, 2016. The chemosensory receptors of codling moth *Cydia pomonella* – expression in larvae and adults. *Sci. Rep.*, 6: 23518.

Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2004. Research advance on molecular mechanism of odors perception in insects. *J. Agric. Biotechnol.*, 12(6): 720 – 726. [王桂荣, 吴孔明, 郭予元, 2004. 昆虫感受气味物质的分子机制研究进展. 农业生物技术学报, 12(6): 720 – 726]

Wang X, 2013. Identification and Functional Analysis of the Olfactory Co-receptor Oreo in Blowfly Species. PhD Dissertation, Central South University, Changsha. [王翔, 2013. 丽蝇嗅觉共同受体Orco的克隆、鉴定及其功能研究. 长沙: 中南大学博士学位论文]

Wanner KW, Anderson AR, Trowell SC, Theilmann DA, Robertson HM, Newcomb RD, 2007. Female-biased expression of odorant

receptor genes in the adult antennae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 16(1): 107 – 119.

Wicher D, 2018. Tuning insect odorant receptors. *Front. Cell. Neurosci.*, 12: 94 – 100.

Wu H, Li RT, Dong JF, Jiang NJ, Huang LQ, Wang CZ, 2018. An odorant receptor and glomerulus responding to farnesene in *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.11.006.

Wu JX, 2013. Agricultural Entomology. North, 2nd ed. China Agriculture Press, Beijing. 308 – 311.［仵均祥, 2013. 农业昆虫学(北方本 第 2 版). 北京: 中国农业出版社. 308 – 311］

Yang L, Zeng ZJ, Zhang LZ, 2017. Cloning and sequencing analysis of *Odour receptor* 170 in honeybees, *Apis cerana cerana*. *J. Environ. Entomol.*, 39(1): 48 – 54.［杨乐, 曾志将, 张丽珍, 2017. 中华蜜蜂气味受体基因 *AcOr*170 的克隆与序列分析. 环境昆虫学报, 39(1): 48 – 54］

Zhang GH, 2012. Molecular Characterizations and Prokaryotic Expression of Olfactory Related Genes in *Grapholita molesta* (Busck). PhD Dissertation, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi.［张国辉, 2012. 梨小食心虫嗅觉相关蛋白基因的分子生物学特性及其原核表达研究. 陕西杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文］

Zhang GH, Li YP, Xu XL, Chen H, Wu JX, 2012. Identification and characterization of two general odorant binding protein genes from the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck). *J. Chem. Ecol.*, 38(4): 427 – 436.

Zhang GH, Liu YF, Wu JX, 2012. cDNA cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of a chemosensory protein from the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomol. Sin.*, 55(6): 668 – 675.［张国辉, 刘彦飞, 仵均祥, 2012. 梨小食心虫化学感受蛋白 cDNA 的克隆、序列分析及原核表达. 昆虫学报, 55(6): 668 – 675］

Zhang GH, Wu JX, 2012. Behavioral rhythms of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Northwest A&F Univ.* (*Nat. Sci. Ed.*), 40(12): 131 – 135.［张国辉, 仵均祥, 2012. 梨小食心虫成虫行为节律研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 40(12): 131 – 135］

Zhang J, Liu CC, Yan SW, Liu Y, Guo MB, Dong SL, Wang GR, 2013. An odorant receptor from the common cutworm (*Spodoptera litura*) exclusively tuned to the important plant volatile cis-3-hexenyl acetate. *Insect Mol. Biol.*, 22(4): 424 – 432.

Zhang QH, Wu ZN, Zhou JJ, Du YJ, 2017. Molecular and functional characterization of a candidate sex pheromone receptor OR1 in *Spodoptera litura*. *Insect Sci.*, 24(4): 543 – 558.

Zhang S, Zhang YJ, Su HH, Gao XW, Guo YY, 2009. Cloning and tissue specific expression of olfactory receptors in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Acta Entomol. Sin.*, 52(7): 728 – 735.［张帅, 张永军, 苏宏华, 高希武, 郭予元, 2009. 棉铃虫气味受体的克隆与组织特异性表达. 昆虫学报, 52(7): 728 – 735］

Zhang XY, Wang FZ, Fan WJ, Pan LN, Zhu GP, Lin YP, Wang J, Li M, 2018. Phylogenetic analysis on the olfactory receptor 1 gene of *Chouioia cunea* Yang. *J. Tianjin Normal Univ.* (*Nat. Sci. Ed.*), 38(2): 29 – 34.［张新玥, 王凤竹, 范伟健, 潘丽娜, 朱耿平, 林艳平, 王静, 李敏, 2018. 白蛾周氏啮小蜂普通气味受体 OR1 的进化分析. 天津师范大学学报(自然科学版), 38(2): 29 – 34］

Zhang XY, Zhu XQ, Gu SH, Zhou YL, Wang SY, Zhang YJ, Guo YY, 2016. Silencing of odorant binding protein gene *AlinOBP*4 by RNAi induces declining electrophysiological responses of *Adelphocoris lineolatus* to six semiochemicals. *Insect Sci.*, 24(5): 789 – 797.

Zhang Y, 2016. Cloning, Expression and Functional Research of GmolOBP1 and GmolOBP6 of *Grapholita molesta* Busck (Lepidoptera: Tortricidae). MSc Thesis, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi.［张燕, 2016. 梨小食心虫气味结合蛋白 GmolOBP1 和 GmolOBP6 的克隆、表达及功能研究. 陕西杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文］

Zhang YC, Fan YY, An SH, Li WZ, Qiao Q, Guo XR, Luo MH, Yuan GH, 2013. Molecular cloning and tissue-specific expression of odorant receptor *OR*18 gene from *Helicoverpa assulta* (Guenée). *J. Henan Agric. Univ.*, 47(1): 49 – 54.［张元臣, 范荫荫, 安世恒, 李为争, 乔奇, 郭线茹, 罗梅浩, 原国辉, 2013. 烟夜蛾气味受体 *OR*18 基因克隆及组织特异性表达. 河南农业大学学报, 47(1): 49 – 54］

Zhang ZX, Zhang MP, Wang GR, Liu Y, 2016. Cloning and characterization of an odorant receptor gene *AlucOR*40 in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(6): 592 – 601.［张志翔, 张美萍, 王桂荣, 刘杨, 2016. 绿盲蝽气味受体基因 *AlucOR*40 的克隆及功能研究. 昆虫学报, 59(6): 592 – 601］

Zhao HM, Yi X, Hu MY, An GD, Wang HD, Huang L, 2013. Gene cloning and expression profiling of atypical odorant receptors *Orco* gene in *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *J. Huazhong Agric. Univ.*, 32(1): 40 – 47.［赵海明, 易欣, 胡美英, 安国栋, 王会冬, 黄林, 2013. 桔小实蝇非典型气味受体 *Orco* 基因的克隆与表达谱分析. 华中农业大学学报, 32(1): 40 – 47］

（责任编辑：马丽萍）